

腫瘍拒絶局所におけるリンパ球遊走因子の リンパ球—血管内皮細胞相互作用に及ぼす影響

野村直弘^{1,2} 上出利光³

¹ 札幌医科大学医学部病理学第1講座 (主任 菊地浩吉 教授)

² 札幌医科大学医学部内科学第3講座 (主任 阿部庄作 教授)

³ 北海道大学免疫研究所免疫病態部門教授

The Effect of Lymphocyte Chemotactic Factor on Lymphocyte Adhesion to Endothelial Cells in Tumor Rejection

Naohiro NOMURA^{1,2} and Toshimitsu UEDE³

¹ Department of Pathology (Section 1), Sapporo Medical University
School of Medicine (Chief: Prof. K. KIKUCHI)

² Department of Internal Medicine (Section 3), Sapporo Medical University
School of Medicine (Chief: Prof. S. ABE)

³ Professor, Section of Immunopathogenesis, Institute of Immunological
Science, Hokkaido University

ABSTRACT In order to analyze mechanisms controlling infiltration of T lymphocytes into tumor tissues, HEV cells were isolated from cervical lymph nodes of Fischer rats and incubated with lymphocytes under stimulation by various cytokines including lymphocyte migration factor-b (LMF-b).

LMF-b augmented the binding of lymphocytes to HEV cells. Furthermore, LMF-b was not only chemotactic for CD8+ T cells, but augmented the binding of CD8+ T cells to HEV cells. The augmented binding by LMF-b was inhibited by the anti-lymphocyte function associated antigen-1 (LFA-1) antibody, anti-CD2 antibody, and fibronectin derived peptide, CS-1.

It was suggested that the augmentation of lymphocyte adhesion to HEV cells by LMF-b was mediated by the lymphocyte function associated antigen-1/intercellular adhesion molecule-1 (LFA-1/ICAM-1) pathway, the CD2/LFA-3 pathway, and the very late antigen-4/CS-1 (VLA-4/CS-1) pathway. (Received October 27, 1993 and accepted January 16, 1994)

Key words: Lymphocyte Migration Factor, Adhesion Molecules,
Lymphocyte-Endothelial Interactions

1 諸 言

腫瘍内浸潤リンパ球がラットやヒトで腫瘍細胞の増殖の制御に重要な役割を担っていることが報告されている。特に腫瘍免疫における局所浸潤 T リンパ球は機能的には多彩な集団から成り立ちこの T リンパ球の解析が腫瘍免疫解析で最も基本的なものであると考えられる^{1,2)}。

ラットの同系腫瘍拒絶モデルにおいて腫瘍局所へ先ず好中球、マクロファージの浸潤がおこり続いて腫瘍内へ CD4 陽性 T 細胞の浸潤がみられ、さらに CD8 陽性 T 細胞の浸潤が優勢となり腫瘍の拒絶が完了することが報告されている。この CD8 陽性 T 細胞は腫瘍細胞に対して強い細胞障害活性を示す最終的なエフェクター細胞である³⁾。これらの細胞群の浸潤の制御のひとつにはリンパ球遊走因子が腫瘍局所において産生されてい

る事が報告されている。

すなわちリンパ球遊走因子-a (Lymphocyte Migration Factor-a: LMF-a) は腫瘍浸潤好中球により産生され、リンパ球遊走因子-b (Lymphocyte Migration Factor-b: LMF-b) は腫瘍浸潤 CD4 陽性 T 細胞により産生されることが知られている。LMF-a, LMF-b はそれぞれ CD4 陽性 T 細胞, CD8 陽性 T 細胞に対し遊走活性を示すことから、これらの遊走因子が腫瘍局所で産生され、リンパ球の腫瘍内への浸潤の制御の機序の一つとして関与しているものと考えられる^{4,5)}。

しかしリンパ球は血流中から目的部位に到達するまでに多くの障壁を越えて行かなければならず、それは単純に遊走因子の存在のみでは説明がつけられない。この障壁の中で最も重要なものは血管内皮である。生体ではリンパ球は恒常的に血流からリンパ節の高内皮細静脈を通りリンパ節内に入り胸管へ集合した後再び血液中に戻る再循環が繰り返されている⁶⁾。また慢性炎症局所などの末梢組織においてリンパ球が局所の血管内皮に選択的に接着能を持つ⁷⁾ことが観察され、局所における血管内皮の認識、接着、血管外への遊出などの、リンパ球と血管内皮の相互作用の検討は腫瘍制御機序解明の重要な課題の一つであろう。

最近、白血球と血管内皮の接着は幾つかの炎症性サイトカインにより制御されていることが知られている。本研究では、腫瘍局所で産生された LMF-b が他の既知のサイトカインと同様にリンパ球と血管内皮の接着に影響を与え得るか検討を加えたので報告する。

2 実験材料及び方法

2.1 実験動物

静岡動物センター（浜松）より購入した週齢 6-8 週の雌 Fischer ラットを用いた。

2.2 抗体および試薬

抗ラットリンパ球単クローン抗体は当教室で作製した R1-3B3, R1-10B5, RTH-7, R2-1A6 を用いた。これらはそれぞれラットの panT 細胞抗原 (CD5), killer/suppressorT 細胞抗原 (CD8), helper/inducerT 細胞抗原 (CD4), 顆粒球・マクロファージを認識する抗体である。この他、岐阜大第 2 病理高見博士より供与されたラットの pan B 細胞を認識する抗体 RLN-9D3, Dr. A. F. Williams より供与されたラット T 細胞のヒト CD2 抗原に相当する抗原を認識する抗体 MRC OX-34, 東京都臨床研究所免疫部門宮坂昌之博士より供与された LFA-1 (Lymphocyte function as-

sociated antigen-1) に対する抗体 WT.1 および ICAM-1 (Intercellular adhesion molecule-1) に対する抗体 1A29 も使用した。北海道大学免疫科学研究所化学部門 済木育夫博士より供与されたファイブネクチンの機能的ドメインのうちヘパリン結合ドメイン H271, H271 とヘパリン結合ドメインの融合ペプチド CH271, RGD 配列を繰り返し単位に持つ poly RGD, III CS 領域内に存在する CS-1 の各ペプチドを使用した。抗マウス Ig 抗体はあらかじめラット血清により吸収して使用に供した。

2.3 腫瘍局所組織の血管内皮の免疫染色

腫瘍免疫ラットおよび非免疫ラットの背部に T-9 gliosarcoma 細胞を接種し、それぞれ 24 時間後、96 時間後に局所を切除し凍結切片を作成した。R2-1A6 抗体を用いて ABC 法により免疫染色を行い血管内皮の染色性を観察した。

2.4 高内皮細静脈 (high endothelial venule: HEV) 細胞の分離

HEV 細胞は Fischer ラットの頸部リンパ節より Ager らの方法⁸⁾に基づいて分離した。Fischer ラットの頸部リンパ節を数個摘出し、PBS で洗浄 3 回行った。この後に鉗で細切し、10 ml の RPMI1640 培養液のなかに 2 分間静置。上清を除いた後、組織を 3 回 RPMI1640 培養液で洗浄した。この後 0.5% type II コラゲゼを含む RPMI1640 培養液に 37°C, 60 分反応させた。反応後、十分にピペティングし 100 μ m ナイロンメッシュを通し細胞浮遊液を得た。これを 1500 rpm 5 分間遠心し、さらに 3 回 RPMI1640 培養液で洗浄し、得られた細胞をフラスコ内で 12 時間培養し非付着細胞を除去。その後 20% FCS 加 RPMI1640 にて培養し 5 継代培養以内に使用に供した。

2.5 HEV 細胞の同定

HEV 細胞は次の項目により確認した。第一に、2.5.1, 2.5.2 で述べるように培養細胞は薄く、広い細胞質を持ちリンパ球との接着能を保持していること⁹⁾。第二に 2.5.3 で述べるように ³⁵S sulfate の取り込み⁹⁾があること。第三に 2.5.4 で述べるようにラット HEV 細胞と反応する R2-1A6 抗体により染色されること¹⁰⁾である。

2.5.1 リンパ球との接着能の確認

8 穴のスライドグラス (Lab-Tek chamber slides: Nunc, Naperville, IL) に 3×10^4 個/well の HEV 細胞を入れ、24 時間培養し confluent の状態にする。Fischer ラット脾リンパ球を 4×10^6 個/ml に調整し、0.5 ml を well 内に静かに入れる。37°C 5%CO₂ 下に 3 時間

well を静置し、その後 37°C RPMI1640 培養液内でゆっくりと洗浄し、非付着細胞を除去する。一晚風乾したのちにギムザ染色をし、光顕下に観察した。

2・5・2 電子顕微鏡による潜り込み能の確認

2・5・1 の方法で作成した脾リンパ球と HEV 細胞を co-culture した well を、37°C RPMI1640 培養液内で洗浄した後 2% グルタルアルデヒドで 4°C 1 時間で固定し、PBS で洗浄し、1% オスミウム酸で 4°C 2 時間固定を行った。エポン樹脂に包埋した後に切片を矢状断で作成し鏡検した。

2・5・3 ^{35}S sulfate の取り込み

分離培養したラット HEV 細胞を 96 穴プレートに 1×10^4 個/well の濃度で培養する。そこへ $50 \mu\text{Ci}/\text{ml}$ (20% FCS 加 PBS) の $\text{Na}_2^{35}\text{SO}_4$ を 0.1 ml ずつ加え 3 時間及び 12 時間反応させた。PBS で 3 回洗浄し 2% SDS で溶解し β シンチレーションカウンターで放射活性を測定した。同様に東京都臨床研究所免疫部門宮坂昌之博士より供与された cell line 化したラット HEV 細胞 (Ax 細胞)¹¹⁾ および Wister ラットの fibroblast 由来の WFB 細胞¹²⁾ での取り込みも測定した。

2・5・4 R2-1A6 による免疫染色

8 穴スライドグラスに 3×10^4 個/穴の HEV 細胞を入れ 24 時間培養し confluent の状態にした後、プラスチックガセットをはずし 4°C アセトンに 10 分で固定した。この後、1 次抗体に R2-1A6 抗体を用いて ABC 法により免疫染色を行った。

2・6 腫瘍感作ラットの作製

Ibayashi らの方法³⁾ に従い Fischer ラットを T-9 細胞により免疫した。すなわち 1×10^7 個の T-9 細胞を同系の Fischer ラットの背部に皮下注射した。10 日後、腫瘍組織は外科的に除去し、そのあと一週間ごとに $50 \mu\text{g}/\text{ml}$ のマイトマイシン C で処理した 1×10^7 個の T-9 細胞を皮下注射した。このマイトマイシン C 処理細胞の接種の操作を 5 回繰り返して免疫を成立させた。

2・7 細胞の分離

脾リンパ球は Fischer ラットの脾臓より Ficoll-Conray 比重遠心法 (比重 1.096) により分離し、マクロファージと好中球は R2-1A6 抗体による panning 法で除去した。Wright-Giemsa, エラスターゼ染色により 99% 以上はリンパ球で占められている事を確認した。

2・8 LMF-b の産生と精製

Shijubo らの方法⁹⁾ により LMF-b を作製した。T-9 gliosarcoma 細胞感作ラット作製完了後一週間目に同腫瘍細胞を 1×10^7 個右足趾に注射した。4 日後に腫瘍組織を無菌的に切除し浸潤細胞を分離した。この細胞

を $5 \times 10^6/\text{ml}$ の濃度で 12 時間培養し、培養上清を回収し starting buffer で透析した後 Mono Q anion exchange column (Pharmacia) により分画した。それぞれの分画を Boyden chamber assay によりリンパ球遊走活性を確認した後、3 番目の活性ピークを蒸留水で透析し、2% Bio-Lyte 3/10 の carrier ampholyte を加え等電点電気泳動 (IEF: Rotofor, Bio-Rad) により分離した。LMF 活性は等電点 8.0 の部分に認められこれをさらに Superose12HR 10/30 カラムで分離し、gel filtration により得られた分子量 26000 の single peak を LMF-b として使用した。

2・9 Binding assay and Binding inhibition assay

リンパ球の標識は 1×10^7 個の脾リンパ球を 1 ml の PBS に浮遊させ $10 \mu\text{Ci}$ の ^{51}Cr と 37°C、1 時間培養して行った。これを 0.1% BSA 加 PBS で 3 回洗浄した後のリンパ球を binding assay に使用した。

HEV 細胞は 8 穴の Lab-Tek chamber slide を用いて、 $2 \times 10^4/\text{well}$ の濃度で培養した。これに ^{51}Cr でラベルした脾リンパ球を $1 \times 10^7/\text{ml}$ の濃度に調節し well に 0.5 ml 加え 37°C で 3 時間反応を行った。

さらにサイトカインの刺激により、この結合が増強するか検討した。すなわち ^{51}Cr による脾リンパ球の標識前に、各種のサイトカインで脾リンパ球あるいは HEV を刺激した。用いたサイトカインは LMF-b $100 \text{ ng}/\text{ml}$, TNF- α (Sigma Chemical Co.) $50 \text{ U}/\text{ml}$, IL-1 β (和光純薬, 東京) $20 \text{ U}/\text{ml}$, IFN- γ (Toray Research Center) $50 \text{ U}/\text{ml}$, IL-8 $1 \text{ ng}/\text{ml}$ (国立予防衛生研究所鈴木博士より供与), G-CSF (中外製薬) $50 \text{ ng}/\text{ml}$ IL-4 (Genzyme) $10 \text{ ng}/\text{ml}$ の各濃度に調整し 37°C、12 時間で刺激した。

また、結合に関与する接着分子を明らかにするために上記結合実験を培養中に各種抗体やペプチドを共存させて行った。すなわち、リンパ球と HEV は抗 LFA-1 抗体、抗 ICAM-1 抗体、抗 CD2 抗体及びこれらの組み合わせによる抗体の存在下や、各合成ペプチド $100 \mu\text{g}/\text{ml}$ の存在下で 37°C、3 時間反応させた。

反応終了後、スライドグラス上の well をゆっくりと 37°C PBS により洗浄し培養液と非付着細胞を完全に除去した。その後、 $0.5 \text{ ml}/\text{NP-40}$ を各 well に加え、上清を回収しその放射性活性を測定した。HEV 細胞に接着した細胞数は以下の式で算定した。

$$\% \text{bound} = \frac{\text{radioactivity (c.p.m.) in } 0.5 \text{ ml lysate}}{\text{radioactivity (c.p.m.) in } 0.5 \text{ ml original suspension}}$$

2・10 HEV 細胞に接着した脾リンパ球亜型の同定

2・5・3 の方法で HEV 細胞に接着した脾リンパ球を各

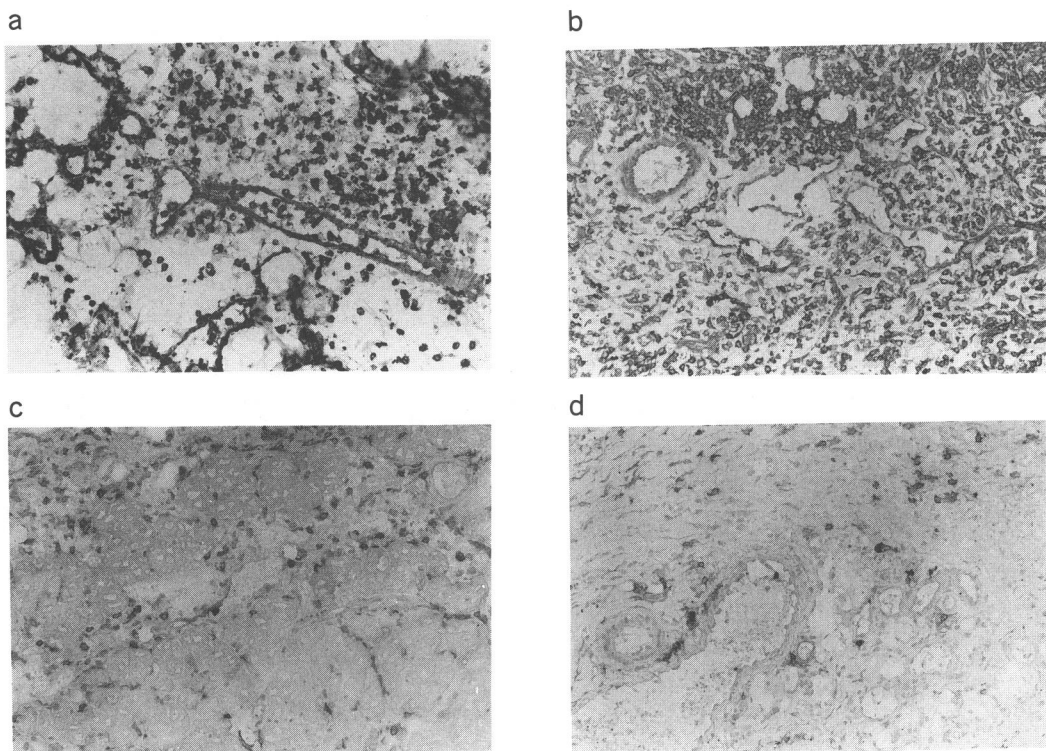


Fig. 1 Expression of R2-1A6 antigen on HEV-like endothelial cells.

Tumor tissues were obtained from immune rats at 24h(a) or 96h(b) after tumor cell injection and from non-immune rats at 24h(c) or 96h(d) after tumor cell injection. Tissues were stained by R2-1A6 antibody as described in Materials and Methods.

種の抗体で免疫染色した。4℃アセトンで10分間固定したのちR1-3B3, R1-10B5, RTH-7, RLN-9D3の各抗体を4℃ overnightで反応させた。PBSで洗浄後プレパラートをABC法により免疫染色し、光顕400倍20視野中の免疫染色された細胞数を算定した。

2・11 統計処理

測定値は、平均値および標準誤差で表した。有意差検定にはstudent's *t*-testにより危険率5%以下を有意差ありとした。

3 成 績

3・1 腫瘍局所におけるHEV様血管の発現

T-9 gliosarcoma細胞で免疫したFischerラットに同腫瘍細胞を接種を行うと、局所に12時間から24時間後に好中球が著明に浸潤した血管内に集積している像が見られた。さらにR2-1A6陽性の血管の出現が認められた。一方、非免疫ラットではこの染色性は殆ど認められなかった (Fig. 1)。

3・2 HEV細胞の確認

3・2・1 Giemsa染色 形態及びリンパ球の接着、潜り込み

2・4の方法により得られた細胞群は薄く幅広い細胞質をもったHEV様細胞と細長いfibroblast様細胞、及びマクロファージの混在した細胞群であった。HEV様細胞は20%FCS加RPMI1640で増殖し、初代培養1-2週間後にconfluentとなり継代培養可能であった。fibroblast様細胞とマクロファージは混在していたが、殆ど増殖が見られなかった。ラット脾リンパ球とco-cultureすることによってラット脾リンパ球はHEV細胞表面への接着性が認められた。(Fig. 2)。また染色がやや淡くHEV細胞とスライドガラスの間へ潜り込んだと考えられるリンパ球も認められた。

3・2・2 脾リンパ球の潜り込みの確認

電子顕微鏡により脾リンパ球は明らかにHEV細胞とガラスライドの間に移動していることが確認される (Fig. 3)。またHEV細胞間より潜り込みつつある像

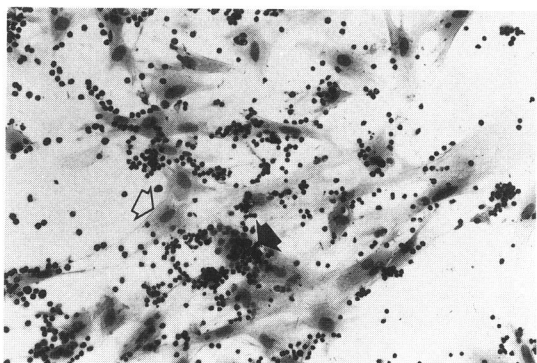


Fig. 2 HEV cells interacting with splenic lymphocytes Open arrows (⇨) indicates HEV cells. Closed arrows (➡) indicate bound lymphocytes. (×200)

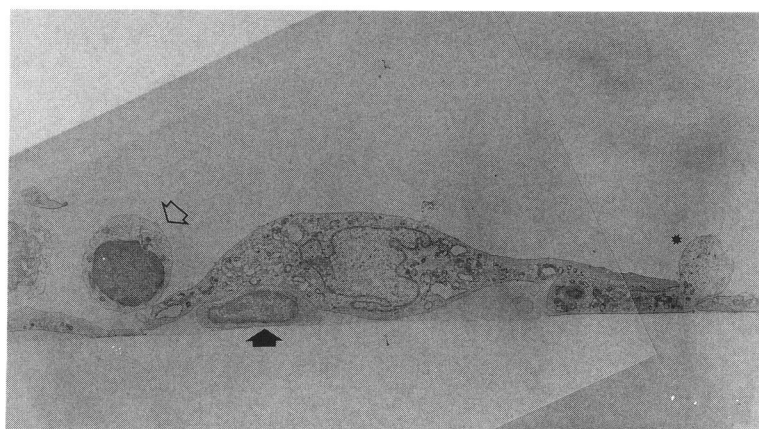


Fig. 3 Electron microscopic observation of HEV-lymphocyte interaction. An open arrow indicates a lymphocyte adhering to cell surface of HEV. A closed arrow indicates the lymphocyte located under the cytoplasm of HEV. * indicates the lymphocyte transmigration underneath the cytoplasm of HEV.

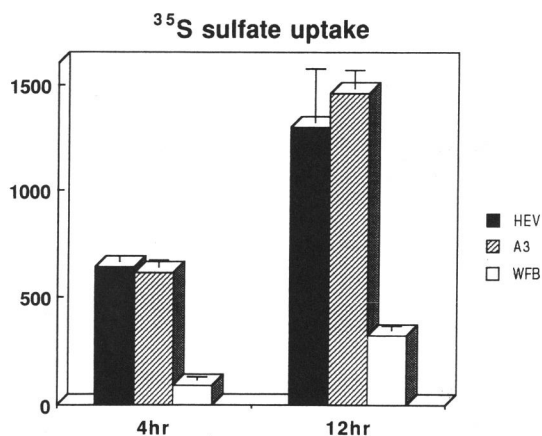


Fig. 4 Uptake of ³⁵S-sulfate by HEV cells. HEV cells, Ax cells (an established HEV cell line), and WFB cells were incubated with 5 μ Ci of Na₂ ³⁵SO₄ for 4h and 12h. Values expressed as a mean cpm \pm SE. ³⁵S sulfate uptake of HEV cells and Ax cells was approximately 6 times higher than that of WFB cells.

も一部に認められた (Fig. 2 *).

3・2・3 ³⁵S sulfate の取り込み

³⁵S sulfate の取り込みは4時間, 12時間と継続的に測定した. 分離培養した HEV 細胞, Ax 細胞のみにほぼ等しく強い取り込みが見られた. これは WFB 細胞と比較して約6倍の強度であった (Fig. 4).

3・2・4 R2-1A6 抗体による染色性

分離された HEV 様細胞はほとんどが R2-1A6 染色陽性を示した (Fig. 5).

3・3 ラット各種リンパ球と HEV 細胞の接着

標識ラットリンパ球を Fischer ラットの頸部リンパ節より分離した HEV 細胞と反応させた. 脾リンパ球の約20%が HEV 細胞に接着したが, 一方ラット胸腺細胞と

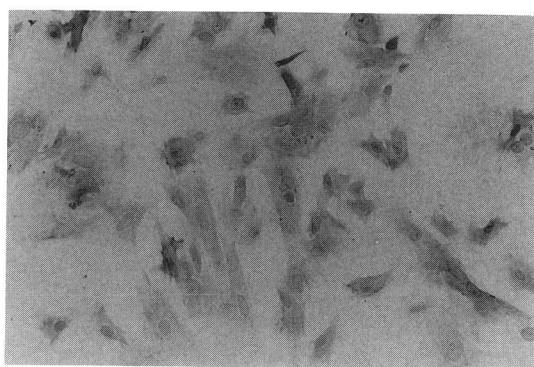


Fig. 5 The expression of R2-1A6 antigen is immunohistologically positive on HEV-like cells derived from rat cervical lymph nodes.

HEV 細胞の接着は弱く, また頸部リンパ節や腸間膜リンパ節由来のリンパ球は7%以下の接着を見たのみであった (Fig. 6).

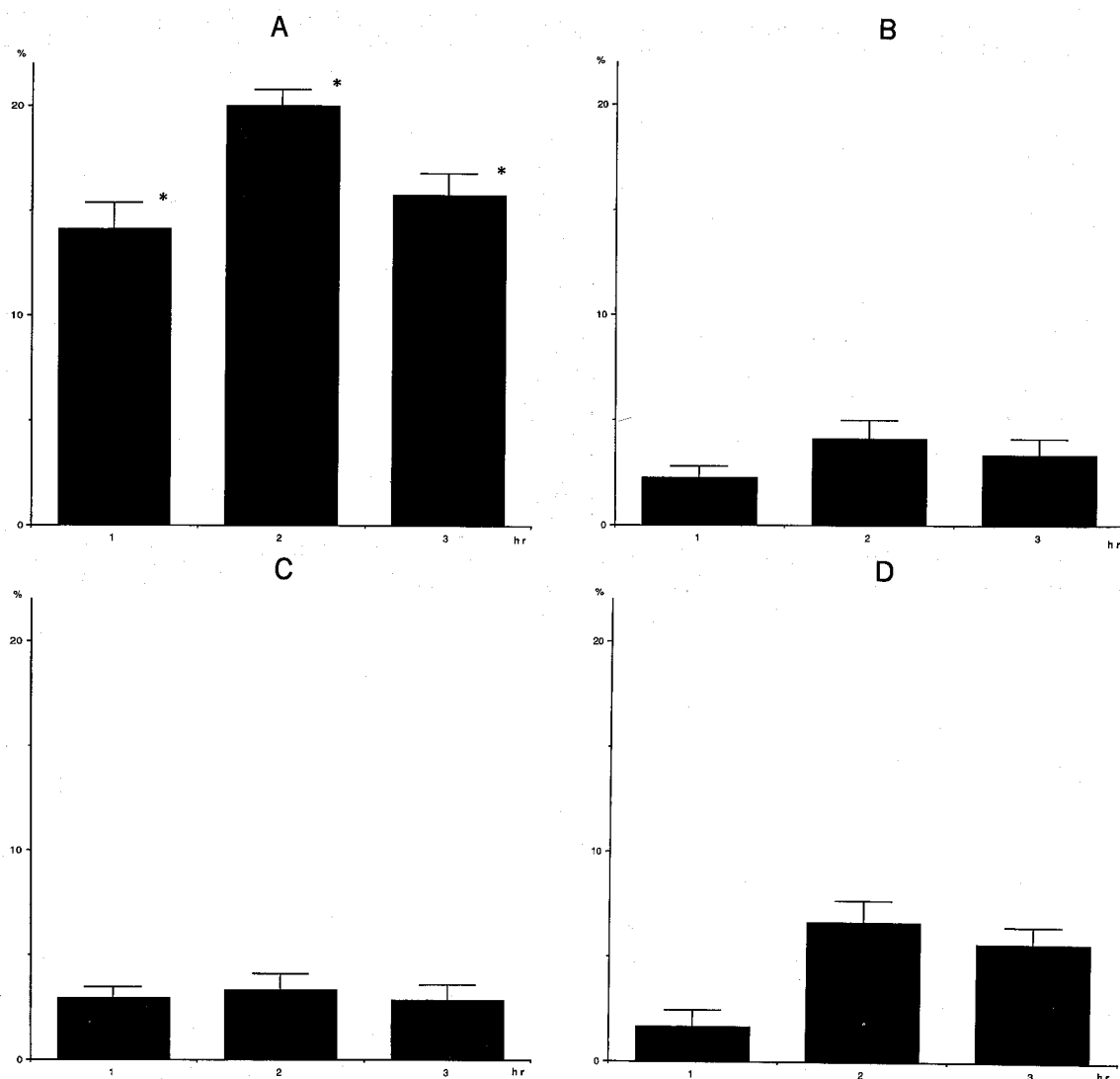


Fig. 6 Binding of various rat lymphoid cells to HEV.

Radiolabelled lymphoid cells were added to the subconfluent monolayer of HEV and incubated for 1, 2 or 3h at 37°C.

Bound radioactivities were measured. Values represent mean percentage of radioactivity bound \pm SEM.

A: splenic lymphocyte

B: thymocyte

C: mesenteric lymph node cell

D: cervical lymph node cell

* $p < 0.01$

3・4 LMF-b の HEV とリンパ球の接着に対する影響

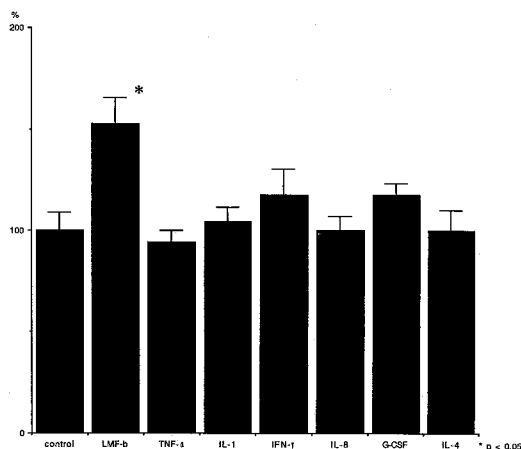
脾リンパ球と HEV 細胞の接着に関して LMF-b や、他のサイトカインがどの様に影響を及ぼしているか検討した。脾リンパ球または HEV 細胞を各種のサイトカインで 37°C, 12 時間で刺激した。洗浄後、脾リンパ球は HEV 細胞と incubation し接着性をみた。(Fig. 7)。リンパ球を各種のサイトカインで刺激した場合、LMF-b のみが脾リンパ球と HEV の接着を増強した。しかし他

のサイトカイン、すなわち $\text{TNF-}\alpha$, $\text{IL-1}\beta$, IL-4 , G-CSF , $\text{IFN-}\gamma$, IL-8 はいずれも接着を増強させなかった。また HEV を刺激した場合は、 $\text{TNF-}\alpha$ や IL-4 で脾リンパ球との接着が増加した。しかし IL-1 は HEV とリンパ球の接着の増強をもたらさなかった。

3・5 リンパ球と HEV 細胞の選択的接着増強作用に関する検討

LMF-b によって HEV 細胞との接着が増強されるリ

(A)



(B)

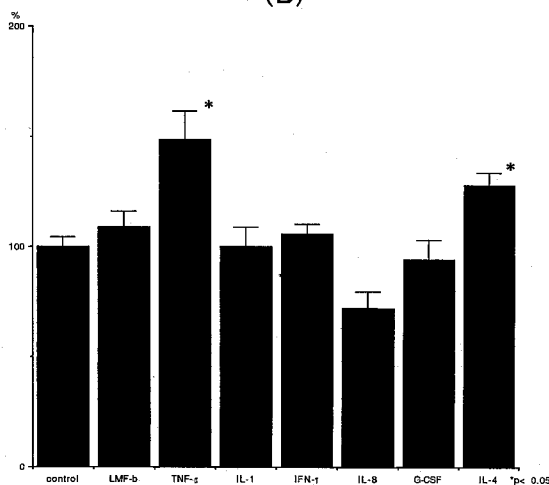


Fig. 7 Lymphocytes (A) or HEV cells (B) were preincubated for 12h at 37°C with 100 µg of LMF-b, 500 U/ml of TNF α , 20 U/ml of IL-1 β , 50 U/ml of IFN- γ , 50 ng/ml of G-CSF or 10 ng/ml of IL-4. After washing, radiolabeled lymphocytes were added to HEV monolayers. Binding of non-stimulated lymphocytes to non-stimulated HEV (control) was expressed as 100%. The results are expressed by the formula:

$$\frac{\text{cpm in experimental group}}{\text{cpm in control}} \times 100\%$$

リンパ球のうちいかなる亜群が増加しているかを検討した。脾リンパ球と HEV 細胞の assay 系に LMF-b 100 ng/ml の存在下に 37°C, 12 時間 incubate した。Table 1 で示したように接着したリンパ球の約 2/3 は B 細胞であった。残りは R1-3B3 陽性の T 細胞であり、こ

Table 1 LMF-b specifically augment adhesiveness of CD8+T cells to HEV cells

	Medium	LMF-b	Ratio
Total bound cell	21.3	35.79	1.68
T cell	5.92	17.27	2.91
B cell	15.75	18.78	1.19
CD8+T cell	2.97	12.6	4.24
CD4+T cell	2.52	5.04	2

のうち CD8 陽性 T 細胞と CD4 陽性 T 細胞の割合はほぼ等しいが LMF-b 刺激後は CD8 陽性 T 細胞が有意に増加していた。

3・6 LMF-b によるリンパ球接着の増強に関する接着分子

リンパ球の培養前後で HEV 細胞との結合に関与する接着分子が変化することが確認された。

未刺激の HEV 細胞と未刺激脾リンパ球との接着は、CS-1 によってのみ抑制され、VLA-4 を介した結合と考えられる。しかし polyRGD H271, CH271, 抗 LFA-1 抗体, 抗 ICAM-1 抗体, 抗 CD2 抗体では抑制されなかった。

一方, 未刺激の HEV 細胞と培養により活性化されたリンパ球の接着は増強し CS-1 のほかに polyRGD, CH271, 抗 LFA-1 抗体により抑制が認められた。しかし抗 ICAM-1 抗体での抑制は見られていない。すなわちこの結合には VLA-4 分子の他に VLA-5, LFA-1 分子が関与していると考えられる。

LMF-b によりリンパ球を刺激するとさらに強く接着が増強されるがこの接着は CS-1, 抗 LFA-1 抗体, 抗 CD2 抗体によりブロックされ, この結合には VLA-4, LFA-1, CD2-LFA-3 の各分子の関与が考えられる。しかしいずれもコントロールレベル以下の抑制は見られなかった (Table. 2)。

4 考 案

4・1 腫瘍局所におけるリンパ球遊走因子

ラットでの腫瘍内浸潤 T 細胞の局所集積機序について報告した。

ラット腫瘍拒絶モデルにおけるエフェクター細胞浸潤の機序の一つはリンパ球遊走因子 (LMF) によって説明される³⁻⁵⁾。すなわち免疫獲得ラットに腫瘍を接種すると接種後 6-24 時間後の局所に好中球, マクロファージの浸潤を認める。このうち好中球が CD4 陽性

Table 2 LMF-b augments adhesiveness of lymphocytes to HEV cells through pathways which was inhibited by CS-1 peptide, anti-LFA-1, anti-ICAM-1, anti-CD2 antibodies

Inhibitor	% bound lymphocytes		
	Freshly isolated	Cultured with Medium	Cultured with LMF-b
None	20.5 ±1.13	25.63±1.79	42.92±1.92
CS-1	*12.81±1.54	*18.26±1.92	*27.23±2.43
Poly (RGD)	23.32±0.95	*16.66±1.92	43.24±2.43
H271	22.29±2.11	25.75±2.18	41.96±2.95
CH271	20.5 ±2.31	*17.62±2.43	43.56±2.43
α -LFA-1	18.45±2.15	*13.97±1.92	*32.03±2.56
α -CD2	20.5 ±1.54	25.3 ±2.31	*31.39±2.24
α -(LFA-1+CD2)	22.45±2.05	*16.66±2.88	*26.27±2.56
α -ICAM-1	24.86±1.44	31.4 ±3.52	40.87±3.84
α -(LFA-1+ICAM-1)	24.09±2.05	22.42±2.24	*35.23±3.19
α -(CD2+ICAM-1)	24.6 ±1.18	25.63±2.05	39.72±3.19
α -(LFA-1+CD2+ICAM+1)	25.37±1.79	22.42±1.79	37.79±3.84

*: p<0.01

T細胞に対し遊走活性を持つ液性因子 LMF-a を腫瘍局所で産生しそれにより4日目にはCD4陽性T細胞の局所浸潤が優位となる。さらにこの浸潤CD4陽性T細胞はCD8陽性T細胞に対して遊走活性を持つ因子である LMF-b を産生しこれにより局所に4日目以降CD8陽性T細胞が浸潤してくると考えられている。しかもこのCD8陽性T細胞は腫瘍に対し細胞障害活性をもつことが認められており最終的に腫瘍の拒絶に関わっていると考えられる。

一方このような現象は免疫の成立しないラットに腫瘍を接種した場合にはほとんど認められず、腫瘍は拒絶されずラットは腫瘍の増大により死亡する。この様に腫瘍拒絶局所においては次々とリンパ球遊走因子の産生がもたらされ、局所へ有効に細胞障害活性を持つエフェクター細胞が誘導されていると考えられる。

しかし、これらの遊走因子の存在のみでリンパ球の局所への集積は十分に説明し得ない。エフェクター細胞が血流中から局所の腫瘍細胞へ到達する過程には幾つかの障壁を越える必要がある。その最も重要な因子は血管内皮であろう。リンパ球が局所の血管内皮を通過するためには、まず第一にリンパ球が局所の血管内皮細胞へ接着し、次にはその内皮細胞の認識、さらにより強い接着をもたらし、最後には血管内皮間へもぐり込み血管外へ遊出する過程が想定される。

これまでにすでに多くのサイトカインがリンパ球と血管内皮の接着^{13,14)}、血管外への遊出に関与していることが知られている。Oppenheimer-Marksら¹⁵⁾はT細胞と血管内皮の反応においてIFN- γ は血管内皮側に作用してT細胞の血管内皮への接着性増強のみならず血管内皮を通過する活性も増強させると報告している。そこでわれわれはLMF-bに注目しこの因子がCD8陽性T細胞に遊走活性を持つのみならず血管内皮とリンパ球に相互作用に何等かの影響を及ぼしているか検討した。

4・2 腫瘍局所におけるHEVの発現
本実験で頸部リンパ節由来のHEV細胞を用いた根拠はHEVは非リンパ組織でも発達することができる事実にある。Duijvesijnら¹⁶⁾はマウスの肺、骨髄由来の微小血管内皮細胞がIFN- γ の刺激によりHEVへと変換することを示しており、HEVは局所環境の因子によりコントロールされているものと考えられる。またHendriksら¹⁸⁾は、リンパ節へリンパ液の流入が止まるとリンパ球の接着や滞り込みを支持し得なくなり形態的にもHEVは平坦な静脈となる事を報告している。またヒト腫瘍組織の観察で、腫瘍組織内でHEV様の血管の周囲にはリンパ球浸潤が強くとめられるが、HEV様血管の見られない部位にはリンパ球浸潤が少ないとの報告もある¹⁹⁾。われわれは拒絶中の腫瘍組織の血管内皮細胞が、R2-1A6抗体により強く染色される事を見出した。R2-1A6抗体はラット好中球、マクロファージを認識する抗体であるが、リンパ節のHEV細胞とも反応し、しかもHEV以外の血管内皮細胞とは反応しない。一方、非免疫ラットでは腫瘍の増殖部位でのリンパ球浸潤は少なく、腫瘍組織内及びその周囲の血管はR2-1A6

抗体の染色性に乏しい。すなわち腫瘍組織での R2-1A6 陽性血管内皮細胞の出現は免疫ラットにおいてより強く認められ腫瘍拒絶と良く相関していると考えられる。HEV 細胞は腫瘍組織において機能的に発達し得ると考えられ HEV 細胞と各種のエフェクター細胞の相互作用を検討することは腫瘍局所へのリンパ球の集積を解析する上で妥当なことである。以上のことから我々は、リンパ球と血管内皮の接着を検討する実験系に HEV 細胞を用いた。

4.3 LMF-b による接着増強に関する接着因子

LMF-b の媒介する HEV 細胞とリンパ球の接着は抗 LFA-1 抗体により抑制された。従って LMF-b 関与のリンパ球と HEV との接着の増強はおそらく LFA-1/ICAM-1 経路を介していると考えられる。しかし抗 ICAM-1 抗体は LMF-b で刺激したリンパ球と HEV との接着を抑制しなかった。LFA-1 抗原は ICAM-1 抗原および ICAM-2 抗原と結合できる²⁰⁾ことが知られていることから我々の系ではリンパ球の接着は ICAM-2 抗原を介する可能性がある。

また LMF-b によるリンパ球細胞の接着増強が CS-1 peptide により抑制され RGD peptide により抑制されなかった事実は、VLA4 抗原の関与をも示唆するものである。すなわち VLA4 抗原は VCAM-1, CS-1 の 2 つの機能的な receptor を保持²¹⁾しているからである。しかし、本実験では VCAM-1 抗原が LMF-b によるリンパ球接着に関与している可能性は除外されない。

LMF-b によるリンパ球-HEV 接着の増強はほとんど完全に抗 LFA-1 抗体と抗 CD2 抗体のコンビネーションにより阻害される。これは LMF-b のリンパ球と HEV の接着に対する働きは他のサイトカインと比較すると独特のものと考えられる。

T 細胞は、TNF, IL-1 刺激した血管内皮との接着に Selectin family に属している E-selectin (ELAM-1) を使うこと²²⁾が知られている。また E-selectin は好中球と resting CD4 陽性 memory T 細胞の接着にも関与²³⁻²⁵⁾している。LMF-b により HEV と CD4 陽性細胞の接着の増強は少なかったことから LMF-b が媒介する T 細胞の接着に ELAM-1 抗原が強く関与している可能性は低いと考えられる。また Mel 14 抗原の関与はこの研究では検討していない。

LMF-b でリンパ球を 12 時間の刺激したあとに T 細胞と HEV との接着性が増強した。IL-1, TNF- α , IFN- γ , I-L-4²⁶⁾ もまた T 細胞の微小血管への接着を増強する。しかし、IL-1, TNF- α , IFN- γ は T 細胞に限定して作用を及ぼすわけではなくこれらのサイトカインは第一に血管内皮に働き、その後接着性を増強

していると考えられている。例えば IFN- γ に反応した T 細胞の接着の増強は殆どが ICAM-1 の up-regulation によるものである。

我々の実験では、IL-1 の血管内皮に対する作用に対して HEV 細胞を IL-1 で preincubation しても細胞の接着増強は見られなかった。このことは Chin らの報告²⁷⁾でも支持されるが、培養した T 細胞と IL-1 刺激血管内皮の接着は LFA-1 と CD44 の両方が関与しているためであろう。

IL-4 による血管内皮とリンパ球の接着増強は T 細胞に特異的である。IL-4 による血管内皮とリンパ球の接着増強は 4 時間刺激の後で明らかになり、さらに、次第に増加して 18 時間から 24 時間の間にプラトーに達するとされている。IL-4 の target は血管内皮であり、IL-4 による血管内皮とリンパ球の接着は VCAM-1 により媒介されている。我々の系では、LMF-b が実際の接着の増強に関わる他の因子の産生や放出をもたらししている可能性も考えられる。

4.4 LMF-b と既知のサイトカインとの異同

我々は LMF-b のリンパ球への走化性活性増強の他に CD8 陽性 T 細胞の血管内皮細胞と選択的な接着能への活性を示した。これまでの報告の中で類似する現象と考えられるものは、IL-8/NAP-1 を Fischer ラットのリンパ節のリンパ灌流域に注射するとリンパ球のみが HEV 細胞に強く潜り込むこと²⁸⁾である。しかし IL-8/NAP-1 は好中球、T 細胞や好塩基球の走化性反応をもたらず。最近、in vivo での好中球の選択的な減少は CD4 陽性 T 細胞の migration を抑制する報告²⁹⁾がある。これは IL-8 により刺激された好中球が CD4 細胞の走化物質を産生することを示唆している。本実験系では IL-8 の作用は認められなかった。

最近 in vitro で RANTES protein もまたヒト血中単球と CD4 陽性 T 細胞の選択的な潜り込みに関与していることが報告されている³⁰⁾。RANTES や IL-8 は新しいサイトカイン superfamily: RANTES/sis を形成している。これらのサイトカインと比べ LMF-b は CD8 陽性 T 細胞のみに作用し、CD4 陽性 T 細胞や好中球や単球には作用しないことや、in vivo では半精製した LMF-b をラット腹腔内に注射すると選択的に CD8 陽性 T 細胞が集まること³¹⁾が知られている。また IL-8 や RANTES の MW は 8000 以下、LMF-b のそれは 26000 であることから LMF-b と RANTES, IL-8 とは異なる物質であると考えられる。LMF-b は新しいサイトカインである RANTES/sis family と関連している可能性はまだ残されているが、活性は既知のもの

明らかに異なっている。LMF-b のさらなる精製により LMF-b と RANTES/IL-8 との関連が明らかになると考える。

腫瘍局所へのエフェクター細胞の集積は幾つかのステップが想定されるが LMF-b はそのうち血管内皮への認識・接着の段階においても働くことが示唆された。しかしリンパ球はさらに血管内皮の間へ入りそこから組織内へ遊出し標的部位へ移動する機序を有しておりこれらのことは今後有効な assay system の確立により解明すべき課題である。

5 結 語

腫瘍局所で産生されるリンパ球遊走因子 LMF-b のリンパ球と血管内皮との相互作用に対する影響を解析した。

1) ラット HEV 細胞を分離培養しリンパ球と相互作用を調べる実験系を作製した。特に HEV 細胞と脾リンパ球との接着が強く認められた。

2) 脾リンパ球を LMF-b ほか各種サイトカインで刺激したところ LMF-b で処理したリンパ球のみが未刺激の HEV 細胞との接着が増強した。

3) HEV 細胞をそれぞれ各種サイトカインで刺激し未刺激の脾リンパ球との接着をみると、HEV 細胞を TNF- α 、IL-4 で刺激したときのみに増強効果が得られた。

4) LMF-b による HEV とリンパ球の接着は T 細胞に対し増強効果が強く、しかも CD8 陽性 T 細胞に強く認められた。

5) LMF-b による増強された接着は CS-1、抗 LFA-1 抗体、抗 CD2 抗体により抑制された。従って LMF-b を介する接着には LFA-1/ICAM-1 pathway、CD2/LFA-3 pathway、VLA-4/CS-1 pathway の関与が示唆された。

6) 以上の知見から LMF-b はリンパ球遊走活性のみならず腫瘍局所において血管内皮細胞とリンパ球の相互作用にも影響をもたらしている可能性が示唆された。

謝 辞

本稿を終えるにあたり、御指導、御校閲頂きました本学病理学第1講座菊地浩吉教授、並びに内科学第3講座阿部庄作教授に深謝致します。また御協力いただきました教室員各位に感謝致します。

文 献

1. Kikuchi K, Ishii Y, Ueno H, Koshiba H. Cell

mediated immunity involved in autochthonous tumor rejection in rats. *Ann NY Acad Sci* 1976, 276: 188-206.

2. Kikuchi K, Kasai K, Hiratsuka H, Usui T, Kamiya H, Shimokawara I. Significance of local T cells response to human cancer. In: Torisu M, Yoshida T, editors. Basic mechanisms and clinical treatment of tumor metastasis. New York, Academic Press, 1985 143-161.
3. Ibayashi Y, Uede T, Uede T, Kikuchi K. Functional analysis of mononuclear cells infiltrating into tumors: Differential cytotoxicity of mononuclear cells from tumors of immune and nonimmune rats. *J Immunol* 1985, 134: 648-653.
4. Yamaki T, Uede T, Shijubo N, Kikuchi K. Functional analysis of mononuclear cells infiltrating into tumors: III. Soluble factors involved in the regulation of T lymphocyte infiltrating into tumors. *J Immunol* 1988, 140: 4388-4396.
5. Shijubo N, Uede T, Kikuchi K. Functional analysis of mononuclear cells infiltrating into tumors: V. A soluble factor involved in the regulation of cytotoxic/suppressor T cell infiltration into tumors. *J Immunol* 1989, 142: 2961-2967.
6. Gowans JL, Knight EJ. The route of re-circulation of lymphocytes in the rat. *Proc Roy Soc Lond [Biol]* 1964, 159: 257-282.
7. Oppenheimer-Marks N, Ziff M. Binding of normal human mononuclear cells to blood vessels in rheumatoid arthritis synovial membrane. *Arthritis Rheum* 1986, 29: 789-792.
8. Ager A. Isolation and culture of high endothelial cells from rat lymph nodes. *J Cell Sci* 1987, 87: 133-144.
9. Andrews P, Milson DW, Ford WL. Migration of lymphocytes across specialized vascular endothelium. *J Cell Sci* 1982, 57: 277-292.
10. Ishii Y, Matsuura A, Iwaki H, Takami T, Kikuchi K. Two closely related antigens expressed on granulocytes, macrophages and some reticular elements in rat lymphoid tissues: characterization by monoclonal antibodies. *Immunology* 1983, 51: 477-487.
11. Ise Y, Yamaguchi K, Sato K, Yamamura Y, Kitamura F, Tamatani T, Miyasaka M. Molecular mechanisms underlying lymphocyte recirculation: I Functional phenotypical and morphological characterization of high endothelial cells cultured in vitro. *Eur J Immunol* 1988, 18: 1235-1244.

12. Sato N, Torigoe T, Yagihashi A, Okubo M, Takahashi S, Takahashi N, Enomoto K, Yamashita T, Fujinaga K, Kikuchi K. Assessment and establishment of a WKA rat fetus-derived cells for oncogene transfection and analysis of the transformation-associated antigens: *Tumor Res* 1987, 22: 15-26.
13. Cavender D, Saegusa T, Ziff M. Stimulation of endothelial cell binding of lymphocytes by tumor necrosis factor. *J Immunol* 1987, 139: 1855-1860.
14. Cavender D, Haskard DO, Joseph B, Ziff M. Interleukin 1 increases the binding of human B and T lymphocytes to endothelial cell monolayers. *J Immunol* 1986, 136: 203-207.
15. Oppenheimer-Marks N, Ziff M. Migration of lymphocytes through Endothelial cell monolayers: Augmentation by interferon- γ . *Cell Immunol* 1988, 114: 307-323.
16. Duijvestijn AM, Schreiber AB, Butcher EC. Interferon- γ regulates an antigen specific for endothelial cells involved in lymphocyte traffic. *Proc Natl Acad Sci USA* 1986, 83: 9114-9118.
17. Freemont AJ, Ford WL. Functional and morphological changes in post-capillary venules in relation to lymphocytic infiltration into BCG-induced granulomata in rat skin. *J Pathol* 1985, 147: 1-12.
18. Hendricks HR, Eestermans IL. Disappearance and reappearance of high endothelial venules and immigrating lymphocytes in lymph nodes deprived afferent lymphatic vessels: a possible regulatory role of macrophages in lymphocyte migration. *Eur J Immunol* 1983, 13: 663-669.
19. Freemont AJ. The Small blood vessels in areas of lymphocytic infiltration around malignant neoplasms. *Br J Cancer* 1982, 46: 283-288.
20. Staunton DE, Dustin ML, Springer TA. Functional cloning of ICAM-2, a cell adhesion ligand for LFA-1 homologous to ICAM-1. *Nature* 1989, 339: 61-64.
21. Wayner EA, Garacia-Pardo A, Humphries MJ, McDonald JA, Carter WG. Identification and characterization of the T lymphocyte adhesion receptor for an alternative cell attachment domain (CS-1) in plasma fibronectin. *J Cell Biol* 1989, 109: 1321-1330.
22. Graber N, Gopal TV, Wilson D, Beall LD, Polte T, Newman W. T cells bind to cytokine-activated endothelial cells via a novel, inducible sialoglycoprotein and endothelial leukocyte adhesion molecule-1. *J Immunol* 1990, 145: 819-830.
23. Bevilacqua MP, Pober JS, Mendrick DL, Cotran RS, Gimbrone JR MA. Identification of an inducible endothelial-leukocyte adhesion molecule. *Proc Natl Acad Sci USA* 1987, 84: 9238-9242.
24. Picker L J, Kishimoto TK, Smith CW, Warnock RA, Butcher EC. ELAM-1 is an adhesion molecule for skin-homing T cells. *Nature* 1991, 349: 796-799.
25. Shimizu Y, Shaw S, Graber N, Gopal TV, Horgan KJ, Seventer GAV, Newman W. Activation-independent binding of human memory T cells to adhesion molecule ELAM-1. *Nature* 1991, 349: 799-802.
26. Thornhill MH, Kyan-Aung U, Haskard DO. IL-4 increases human endothelial cell adhesiveness for T cells but not for neutrophils. *J Immunol* 1990, 144: 3060-3065.
27. Chin YH, Cai JP, Johnson K. Lymphocyte adhesion to cultured Peyer's patch high endothelial venule cells is mediated by organ-specific homing receptors and can be regulated by cytokines. *J Immunol* 1990, 145: 3669-3677.
28. Lasen CG, Anderson AO, Appella E, Oppenheim JJ, Matsushima K. The neutrophil-activating protein (NAP-1) is also chemotactic for T lymphocytes. *Science* 1989, 243: 1464-1466.
29. Kudo C, Araki A, Matsushima K, Sendo F. Inhibition of IL-8-induced W3/25+ (CD4+) T lymphocyte recruitment into subcutaneous tissues of rats selective depletion of in vivo neutrophils with a monoclonal antibody. *J Immunol* 1991, 147: 2196-2201.
30. Shall TJ, Bacon K, Toy KJ, Goeddel DV. Selective attraction of monocytes and T lymphocytes of the memory phenotype by cytokine RANTES. *Nature* 1990, 347: 669-671.
31. Shijubo N, Uede T, Nomura N, Kikuchi K. Functional Analysis of Mononuclear Cells Infiltrating into Tumors: Establishment of a New System to Obtain Functionally Active Tumor-infiltrating Cells. *Jpn J Cancer Res* 1990, 81: 28-34.

別刷請求先:

(〒060) 札幌市中央区南1条西16丁目

札幌医科大学医学部病理学第1講座 野村直弘